

⑫ 公表特許公報(A)

平4-506662

⑬ 公表 平成4年(1992)11月19日

⑭ Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

A 61 K 39/385
47/48
C 07 K 15/06

Z

8413-4C
7329-4C
7731-4H

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 接合体ワクチンのためのサイトカニンおよびホルモンのキャリアー

⑯ 特 願 平2-510469

⑰ 出 願 平2(1990)7月16日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)1月10日

⑲ 国際出願 PCT/US90/03983

⑳ 国際公開番号 WO91/01146

㉑ 国際公開日 平3(1991)2月7日

優先権主張 ㉒ 1989年7月14日 ㉓ 米国(U S) ㉔ 380,566

㉕ 発 明 者 ビレイ, サブラモニア

アメリカ合衆国ニューヨーク州14623 ロチエスター・ポールマー
パークウェイ286

㉖ 発 明 者 エビー, ロナルド

アメリカ合衆国ニューヨーク州14623 ロチエスター・ナンバー3・
ウエストスクワイアドドライブ297㉗ 出 願 人 ブラクシス・バイオロジクス・
インコーポレーテッドアメリカ合衆国ニューヨーク州14623 ロチエスター・イーストリ
バーロード300

㉘ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉

㉙ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特
許), NO, SE(広域特許)

請求の範囲

1、そのレセプターが免疫系の細胞上で発現されるサイトカニン、リンホカイン、ホルモン、成長因子またはその一部分へ結合した抗原からなり、免疫変調活性を有し、前記抗原は常態でサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしていない、免疫原性接合体。

2、サイトカニンまたはリンホカインはインターフェロン、インターリューキン-1 α 、インターリューキン-1 β 、インターリューキン-2またはその一部分である、上記第1項記載の接合体。

3、ホルモンまたは成長因子は、腫瘍壊死因子、プロラクチン、表皮成長因子、組織成長因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン様成長因子、ソマトトロピンまたはインスリンである、上記第1項記載の接合体。

4、抗原はサイトカニンまたはホルモンの共有結合している、上記第1項記載の接合体。

5、抗原はサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に還元アミン化により結合している、上記第4項記載の接合体。

6、抗原はサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に遺伝子融合技術により結合している、上記第1項記載の接合体。

7、抗原はウイルス、バクテリア、菌類または温血動物またはヒトの病原体の寄生体の抗原である、上記第1項記載の接合体。

8、抗原は炭水化物を含有する抗原である、上記第1項記載の接合体。

9、炭水化物を含有する抗原はオリゴ糖または多糖である、上記第8項記載の接合体。

10、抗原はバクテリアの荚膜のポリマー、オリゴマーまたはその断片である、上記第1項記載の接合体。

11、ポリマーまたはオリゴマーは、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、カタル球菌(*Branhamella catarrhalis*)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)または破傷風菌(*Clostridium tetani*)から誘導される、上記第10項記載の接合体。

12、ポリマーまたはオリゴマーはポリリボシルリビトールホスフェートである、上記第11項記載の接合体。

13、ポリマーまたはオリゴは肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)から誘導される、上記第11項記載の接合体。

14、ポリマーまたはオリゴマーは、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)の血清型1、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19Fまたは23Fからのものである、上記第13項記載の接合体。

特表平4-506662 (2)

15、ポリマーまたはオリゴマーは、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) のグループAまたはグループCの莢膜のサッカリドである、上記第10項記載の接合体。

16、抗原はバクテリアの細胞壁のペプチドグリカンまたはその断片である、上記第1項記載の接合体。

17、抗原はバクテリアのリポ多糖またはその成分である、上記第1項記載の接合体。

18、製剤学的に許容されうる賦形剤および任意のアジュバントの中の免疫原性接合体からなり、前記免疫原性接合体は、そのレセプターが免疫系の細胞上で発現されるサイトカニン、リンホカイン、ホルモン、成長因子またはその一部分へ結合した抗原からなり、免疫変調活性を有し、前記抗原は常態でサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしていない、ワクチン組成物。

19、サイトカニンまたはリンホカインはインターフェロン、インターリューキン-1 α 、インターリューキン-1 β 、インターリューキン-2またはその一部分である、上記第18項記載のワクチン組成物。

20、ホルモンまたは成長因子は、腫瘍増死因子、プロラクチン、表皮成長因子、組織成長因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン様成長因子、ソマトトロピンまたはインスリンである、上記第18項記載のワクチン組成物。

21、抗原はバクテリア、菌類または温血動物またはヒトの病原体の寄生体の抗原である、上記第18項記載のワクチン組成物。

22、抗原は炭水化物を含有する抗原である、上記第18項記載のワクチン組成物。

oniae) の血清型1、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19Fまたは23Fからのものである、上記第27項記載のワクチン組成物。

29、ポリマーまたはオリゴマーは、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) のグループAまたはグループCの莢膜のサッカリドである、上記第25項記載のワクチン組成物。

30、明瞭のミネラル懸濁液をさらに含む、上記第18項記載のワクチン組成物。

31、温血動物の宿主に有効量のワクチン組成物を投与することからなり、前記ワクチン組成物は、製剤学的に許容されうる賦形剤および任意のアジュバントの中の免疫原性接合体からなり、前記免疫原性接合体は、そのレセプターが免疫系の細胞上で発現されるサイトカニン、リンホカイン、ホルモン、成長因子またはその一部分へ結合した抗原からなり、免疫変調活性を有し、前記抗原は常態でサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしていない、抗原、弱く免疫原性の抗原または非免疫原性の抗原に対する応答を引き出す方法。

32、サイトカニンまたはリンホカインはインターフェロン、インターリューキン-1 α 、インターリューキン-1 β 、インターリューキン-2またはその一部分である、上記第31項記載の方法。

33、ホルモンまたは成長因子は、腫瘍増死因子、プロラクチン、表皮成長因子、組織成長因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン様成長因子、ソマトトロピンまたはインスリンである、上記第31項記載の方法。

23、抗原はオリゴ糖または多糖である、上記第22項記載のワクチン組成物。

24、抗原はバクテリアの莢膜のポリマー、オリゴマーまたはその断片である、上記第23項記載のワクチン組成物。

25、ポリマーまたはオリゴマーは、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、カタル球菌 (*Branhamella catarrhalis*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) または破傷風菌 (*Clostridium tetani*) から誘導される、上記第24項記載のワクチン組成物。

26、ポリマーまたはオリゴマーはポリリポリルリビトールホスフェートである、上記第24項記載のワクチン組成物。

27、ポリマーまたはオリゴ糖は肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) から誘導される、上記第25項記載のワクチン組成物。

28、ポリマーまたはオリゴマーは、肺炎連鎖球菌 (*S. pneum*

34、抗原は炭水化物を含有する抗原である、上記第31項記載の方法。

35、製剤学的に許容されうる賦形剤および任意のアジュバントの中の、免疫原性接合体と混合された、抗原またはその断片からなり、前記免疫原性接合体は、そのレセプターが免疫系の細胞上で発現されるサイトカニン、リンホカイン、ホルモン、成長因子またはその一部分へ結合した抗原からなり、免疫変調活性を有し、前記抗原は常態でサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしていない、接合された抗原および少なくとも1種の他の抗原に対して免疫応答を引き出すための補助ワクチン組成物。

36、サイトカニンまたはリンホカインはインターフェロン、インターリューキン-1 α 、インターリューキン-1 β 、インターリューキン-2またはその一部分である、上記第35項記載の補助ワクチン組成物。

37、ホルモンまたは成長因子は、腫瘍増死因子、プロラクチン、表皮成長因子、組織成長因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン様成長因子、ソマトトロピンまたはインスリンである、上記第35項記載の補助ワクチン組成物。

38、接合した抗原は炭水化物を含有する抗原である、上記第35項記載の補助ワクチン組成物。

39、接合した抗原はバクテリアの莢膜のポリマー、オリゴマーまたはその断片である、上記第38項記載の補助ワクチン組成物。

40、ポリマーまたはオリゴマーは、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、大腸菌 (*Escherich*

特表平4-506662(3)

ia coli)、髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、化膿連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)、カタル球菌(Branhamella catarrhalis)、コレラ菌(Vibrio cholerae)、ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae)、淋菌(Neisseria gonorrhoeae)、百日咳菌(Bordetella pertussis)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)または破傷風菌(Clostridium tetani)から誘導される、上記第39項記載の補助ワクチン組成物。

41、ポリマーまたはオリゴマーはポリリボシルリビトールホスフェートである、上記第40項記載の補助ワクチン組成物。

42、ポリマーまたはオリゴは肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)から誘導される、上記第40項記載の補助ワクチン組成物。

43、ポリマーまたはオリゴマーは、肺炎連鎖球菌(S. pneumoniae)の血清型1、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19Fまたは23Fからのものである、上記第42項記載の補助ワクチン組成物。

44、ポリマーまたはオリゴマーは、髄膜炎菌(N. meningitidis)のグループAまたはグループCの莢膜のサッカライドである、上記第40項記載の補助ワクチン組成物。

チン組成物。

50、バクテリアの表面タンパク質は化膿連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)のMタンパク質である、上記第48項記載の補助ワクチン組成物。

51、抗原はRSウイルスのF、NまたはGタンパク質である、上記第47項記載の補助ワクチン組成物。

52、抗原はRSウイルスのタンパク質Fのペプチド283-315である、上記第51項記載の補助ワクチン組成物。

53、明瞭のミネラル懸濁液をさらに含む、上記第35項記載の補助ワクチン組成物。

54、インターフェューキン-2に結合したポリリボシルリビトールホスフェートからなり、インターフェューキン-2はポリリボシルリビトールホスフェートの免疫原性を修飾することができる、免疫原性接合体。

55、製剤学的に許容されうる賦形剤および任意のアジュバントの中の免疫原性接合体からなり、前記免疫原性接合体はインターフェューキン-2に結合したポリリボシルリビトールホスフェートからなり、インターフェューキン-2はポリリボシルリビトールホスフェートの免疫原性を修飾することができる、ワクチン組成物。

45、抗原はバクテリアの細胞壁のペプチドグリカンまたはその断片である、上記第35項記載の補助ワクチン組成物。

46、抗原はバクテリアのリポ多糖またはその成分である、上記第35項記載の補助ワクチン組成物。

47、抗原は、微生物の抗原、ウイルス抗原、寄生体の抗原、腫瘍の抗原、アレルゲン、ホルモン、レセプター、結合性タンパク質、自己抗原および自己免疫性関係抗原から成る群より選択される、上記第35項記載の補助ワクチン組成物。

48、抗原はバクテリアの表面または外膜のタンパク質またはその一部分である、上記第47項記載の補助ワクチン組成物。

49、抗原は、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、大腸菌(Escherichia coli)、髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、化膿連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)、カタル球菌(Branhamella catarrhalis)、コレラ菌(Vibrio cholerae)、ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae)、淋菌(Neisseria gonorrhoeae)、百日咳菌(Bordetella pertussis)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、肺炎杆菌(Klebsiella pneumoniae)または破傷風菌(Clostridium tetani)のバクテリアの外膜タンパク質またはその一部分である、上記第48項記載の補助ワクチン組成物。

明細書

接合体ワクチンのためのサイトカイニン

およびホルモンのキャリアー

技術的背景

サイトカイニンおよびリンホカイン、例えば、インターフェロン、GM-CSF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-7は、免疫応答の修飾において異なる活性を有することが示された。ホルモンおよび成長因子は、また、免疫系の細胞に対して変調効果を有し、こうして免疫応答を変調することができる。インターフェロン、IL-1およびIL-2は抗原またはミトゲン刺激T細胞の増殖および分化を増加させる。それらは、また、B細胞を刺激して成長させそして抗原に対して抗体の応答を発生させる。いったん活性化されると、B細胞はIL-2レセプターを発現することが示された。ある数の合成を組み換えリンホカイン[ネンチオニ(Nencioni)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol)、139:800-804(1987);クロンハイム(Kronheim)ら、米国特許第4,801,686号;タグリアブエ(Tagliabue)ら、米国特許第4,774,320号;フェルナンデス(Fernandes)ら、米国特許第4,604,377号]は免疫機能を刺激することが示された。しかしながら、炎症および毒性作用は、しばしば、有機体へのサイトカイニンまたはリンホカインの免疫治療的投与を伴う。さらに、これらは一般に短い半減期を有する。

ある種のサイトカニンおよびリンホカインはアジュバント活性を有し、これにより抗原に対する免疫応答を増強することが示された。例えば、ナカムらはインターフェロン-ガンマがいくつかの抗原に対する抗原の形成を2～5倍増強することを実証した。ナカムら、ネイチャー (Nature) 307:381-382 (1984)。ネンチオニ (Nencioni) ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.)、139:800-804 (1987)；ホワード (Howard) ら、欧州特許 (EP) 285441号。

免疫原性が低い胸腺独立の抗原、例えば、多糖に対する抗体の応答の刺激は、近年、強い胸腺依存性タンパク質抗原に多糖を共有カップリングすることによって達成された。ある数のタンパク質、例えば、ジフテリアのトキシノイド、破傷風のトキシノイドおよびジフテリアの毒素の無毒の変異型、CRM₁₉₇、は多糖のキャリアーとして使用される。免疫応答はキャリアーとして使用するタンパク質の型に依存して高度に可変性である。

ある数の接合体が、タンパク質、例えば、リンホカインを安定化および可溶化するために従来記載されてきている。モアランド (Moreland) およびニテッキ (Nitecki) (米国特許第4,745,180号1988年5月17日) は、ヘパリン断片に共有接合したβ-インターフェロン、インターリューキン-2またはイムノトキシンからなる製剤学的組成物を記載している。この接合体は、その非接合形態で本質的に不溶性であるタンパク質を可溶化する手段を提供する。

シュミット (Schmidt) ら (米国特許第4,772,685号、1988年9月20日) は、高分子量のキャリアーのタンパク質への1

ることができる。ホルモンまたは成長因子は、例えば、ウシ、ブタまたはニワトリ由来であることができ、そして腫瘍壊死因子 (TNF)、プロラクチン、表皮成長因子 (EGF)、組織成長因子 (TGF)、顆粒球マクローファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、インスリン様成長因子 (IGF-1)、ソマトロビンまたはインスリン、またはそのレセプターが免疫系の細胞上で発現される任意の他のホルモンまたは成長因子であることができる。

本発明は、さらに、動物に免疫原性量のワクチン組成物を投与することからなり、前記ワクチン組成物は製剤学的に許容されうる賦形剤および任意のアジュバントの中の本発明の免疫原性接合体からなる、免疫応答を引き出す方法に関する。免疫原性接合体は製剤学的に許容されうる賦形剤および任意のアジュバント中で、同時に投与する抗原と混合して、接合した抗原および混合した抗原の両者に対する免疫応答を引き出すために使用できる補助ワクチンを生成し、前記同時に投与する抗原はその抗原を誘導する有機体と同一であるか、あるいは異なる有機体からの接合体、複合体または混合物であることができる。

図面の簡単な説明

第1図は、粗製のポリリボシルリボitolホスフェート (PRP) - rhIL-2接合体と比較して非接合組み換えヒトIL-2 (rhIL-2) の高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) の分析を示す。

第2図は、出発反応におけるPRP対rhIL-2の2:1 (w/w) 比におけるPRP-rhIL-2接合体のクロマトグラムを示す。

第3図は、PRPを添加しないで接合手順を実施した、rhIL-2のモック接合体のクロマトグラムを示す。

L-1誘導ペプチドの免疫原性接合体を記載している。IL-2またはインターフェロンおよび水溶性ポリマー (ポリエチレングリコール) の接合体は記載された [カトレ (Katre) およびクナウフ (Knauf)、米国特許第4,766,106号、1988年6月23日およびWO8700056、1987年、1月15日]。同様に、ガーマン (Garman) [欧州特許 (EP) 183503号、1986年6月4日] は、リンホカインの持続した解放について水溶性ポリマーへ結合したインターフェロンまたはIL-2の接合体を記載している。ホルモンおよび成長因子およびそれらのレセプターについての背景は、例えば、次の文献を参照、ヒル (Hill)、D. J., J. Reprod. Fertility 85:723-734 (1989)；ロウパス (Roupas) ら、Mol. Cell. Endocrinol. 61:1-123 (1989)。

発明の要約

本発明は、免疫原性接合体および免疫原性接合体を含有するワクチン組成物に関する。接合体は、免疫調節活性を有するサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子結合した抗原 (常態でサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしない)、ことに炭水化物を含有する抗原からなり、ここでサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子は抗原の免疫原活性を変調する。サイトカニンまたはリンホカインは、インターリューキン、例えば、インターリューキン-1α、インターリューキン-1β、インターリューキン-2、インターフェロン、例えば、インターフェロンガンマ、または免疫調節活性を有する他のサイトカニンまたはリンホカインであ

第4図は、PRPに対するモノクローナル抗体を使用して検出した、選択した接合体のイムノプロットを示す。左から右に、レーンは次のものを含有する：PRP-CRM、rhIL-2、PRP、PRP-rhIL-2 (2×)、PRP-rhIL-2 (2×)、ブランク、PRP-rhIL-2 (20×)、およびPRP-rhIL-2 (20×)。

第5図a～cは、(a) 非接合組み換えウシIL-2 (BrIL-2)、(b) PRP-BrIL-2 (2:1) 接合体および(c) PRP-BrIL-2 (20:1) 接合体のHPLC分析を示す。

第6図は、PRP-BrIL-2ワクチンのウェスタンブロット分析を示す。プロットはモノクローナル抗PRP抗体 (E117-5) またはポリクローナル抗BrIL-2抗体を示したように使用して展開した。

第7図は、BT-2バイオアッセイにおけるBrIL-2とPRP-BrIL-2接合体との生物学的活性の比較である。

発明の詳細な説明

本発明は、サイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に結合した抗原、とくにタンパク質、ペプチド、オリゴ糖または多糖または他の炭水化物を含有する抗原からなる免疫原性接合体に関する。抗原をサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に接合すると、抗原への免疫応答を修飾することができる免疫原性接合体が得られる。免疫原性の修飾に加えて、接合体の抗原性成分はサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子を安定化することができる。

サイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子は抗原に対する免疫応答を変調する機能をし、そして抗原はサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子の生物学的活性を安定化する。サイ

トカイニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子は、インターリューキン、例えば、インターリューキン-1 α 、インターリューキン-1 β 、インターリューキン-2、インターフェロン、例えば、インターフェロンガンマ、または免疫調節活性を有する他のサイトカイニンまたはリンホカインであることができる。免疫調節活性を有するサイトカイニンまたはリンホカインの一部分または突然変異タンパク質またはミミック (mimic) を、また、使用することができる。好ましくは、リンホカインはインターリューキン-2である。ホルモン、成長因子またはその免疫調節部分は、例えば、ウシ、ブタまたはニワトリ由来であることができる。そして腫瘍壊死因子 (TNF)、プロラクチン、表皮成長因子 (EGF)、組織成長因子 (TGF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、インスリン様成長因子 (IGF-1)、ソマトロピン (成長ホルモン) またはインスリン、またはそのレセプターが免疫系の細胞上で発現される任意の他のホルモンまたは成長因子であることができる。

サイトカイニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子は任意の適当な源から得ることができる。それらは組み換えDNA方法により生成することができる。例えば、いくつかのヒトインターフェロンをエンコードする遺伝子を種々の宿主合成においてクローニングおよび発現して、大量の純粋なインターリューキンの産生が可能となった。さらに、ある種のTリンパ球系統は高いレベルのインターリューキンを産生し、こうしてリンホカイン源を提供する。

抗原または非炭水化物の抗原を含有する炭水化物は、免疫応答を望む任意の源から誘導することができる。炭水化物を含有する抗原または他

クス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) (例えば、血清型a、bおよびc)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

バクテリア以外のポリマーは酵母および菌類、例えば、クリプトコックス・ネオフォルマンス (*Cryptococcus neoformans*)、または癌細胞上に独特に見いだされる炭水化物を含有するユニットまたはアレルゲンに関連して見いだされるものから誘導することができる。

本発明の接合体は、炭水化物を含有する抗原または他の抗原をキャリアヘカップリングするためにこの分野において知られている生物学的に適合性の任意の方法により調製することができる。カップリングの方法は最も好ましくは共有カップリングであり、これにより炭水化物を含有する抗原または他の抗原はサイトカイニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に直接結合される。しかしながら、抗原をサイトカイニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に接合する他の手段は本発明の範囲内に包含される。多数のこのような方法は、炭水化物を含有する抗原または他の抗原をキャリアヘカップリングするために現在入手可能である。ほとんどの方法はアミンまたはアミドの結合をつくるか、あるいはある場合においてチオエステルをつくる。炭水化物を含有する抗原をサイトカイニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に結合する1つのとくに好ましい方法は、次の米国特許に記載されている選

の抗原は、それ自体免疫原性ないか、あるいは弱く免疫原性であるが、サイトカイニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子への接合により免疫原性またはそれ以上となることのできるものであることができる。抗原を含有する炭水化物はオリゴ糖、多糖、ペプチドグリカンおよびグリコペプチドであることができる。問題の炭水化物を含有する抗原の例は、次のものを包含する：バクテリアの莢膜ポリマー、リポ多糖またはリポ多糖の成分、自己免疫関係抗原、アレルゲン、腫瘍関連抗原、菌類およびウイルスの抗原、ホルモンおよびバクテリアの細胞壁成分、例えば、ペプチドグリカンまたはそれらの断片。

バクテリアの莢膜のポリマー、オリゴマーおよびそれらの断片は、ワクチンにおいて有効に使用される可能性を有するが、若いヒトにおいて弱く免疫原性であるのみの抗原のグループに入る。この出願において使用するとき、用語「莢膜のポリマー」は、糖を含有するポリマー、例えば、糖、糖酸、アミノ糖、および糖ホスフェートのポリマーを意味する。これらの「莢膜のポリマー」はしばしば医学の文献において「莢膜の多糖」と呼ばれるが、それらはグリコシド結合以外の結合および糖、例えば、上に列挙したもの以外の成分を含有することがある。

莢膜のポリマー (CP) は多数の異なる型のバクテリアから誘導することができる。これらの型は次のものを包含する：インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、連鎖球菌属 (*Streptococcus*) 種、例えば、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) (とくに血清型1、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19F、および23F)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) およびストレプトコッ

元的アミン化による：米国特許第4, 673, 573号 (Anderson, P. W.)、1987年6月16日発行、および米国特許第4, 761, 283号 (Anderson, P. W.)、1988年8月2日発行、それらの教示を引用によってここに加える。

本発明の接合体を使用して、抗原、例えば、炭水化物を含有する抗原またはサッカリドに対する免疫応答を温血動物において引き出すことができる。この方法は、ワクチン組成物の中のサイトカイニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に結合した炭水化物を含有する抗原からなる接合体の免疫学的に有効な投与量を動物に投与することからなる。ワクチン組成物は微生物の感染の防止に有用である。接合体は製剤学的に許容されうる賦形剤、例えば、生理学的塩類溶液、またはエタノールポリオール (例えば、グリセロールまたはポリプロピレングリコール) と混合して投与することができる。ワクチン組成物は、必要に応じて、次のものを含むことができる：アジュバント、例えば、植物油またはその乳濁液、表面活性物質、例えば、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミノ酸エステル、オクタデシルアミン、リソレクテン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、N, N-ジオクタデシル-N-N'-ビス (2-ヒドロキシエチル) プロパンジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロール、およびブルニックポリオール；ポリアミン、例えば、ピラン、デキストラサルフェート、ポリIG、カルボボル；ペプチド、例えば、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、ツフツシン；免疫刺激複合体 (ISCOMS)；油乳濁液；およびミネラルゲル。本発明の接合体は、また、リポソームまたはISCOMSの中に混入することができる。補助的活性成分をまた使用できる。接合体は、また、ミ

ネラルゲル懸濁液、例えば、明礬、すなわち、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム上に吸着して、炭水化物を含有する抗原に対する免疫応答をさらに変調することができる。

ワクチンはヒトまたは動物に種々の方法で投与することができる。これらは皮内、経皮（例えば、ゆっくり解放するポリマー）、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経口的および鼻内のルートの投与を包含する。このようなワクチンにおける接合体の使用量は、使用する炭水化物を含有する抗原または他の抗原の同一性に依存して変化するであろう。現在の接合体ワクチンへの適合のために伝統的キャリアーとともに使用する確立された投与量の範囲の調節および操作は、当業者の能力の範囲内である。本発明の接合体は、未成年および大人の両者の温血動物、とくに人間の処置における使用を意図する。本発明の方法および接合体の使用は予防の応用に限定されない；治療の応用（例えば、エイズの予防または治療）、ならびに成長、生産性または再生集中される免疫が考えられる。

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) により引き起こされる髄膜炎に対するワクチン接種において有用であるワクチン組成物は、インターフェロン-2 に接合したインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) b型のオリゴマーのポリリボシルピトールホスフェート (PRP) からなるであろう。米国におけるバクテリアの髄膜炎は、最も普通にインフルエンザ菌 (*H. influenzae*) b型により引き起こされる。

本発明の免疫原性接合体は、同一であるか、あるいは異なる有機体からの抗原決定基または抗原と製剤学的に許容されうる賦形剤または任意のアジュバント中で混合して、接合した抗原および混合した非接合抗原

eumoniae) および破傷風菌 (*Clostridium tetani*)。いくつかの特定の抗原は、次のものを包含する：バクテリアの表面および外膜のタンパク質 [例えば、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) またはカタル球菌 (*Branhamella catarrhalis*)] およびバクテリアの表面タンパク質 [例えば、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) からのMタンパク質]。

病原性ウイルスからのウイルスの抗原は次のものを包含するが、これらに限定されない：ヒト免疫欠損ウイルス (IおよびII型)、ヒトT細胞白血病ウイルス (I、IIおよびIII型)、RSウイルス、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、非A型および非B型肝炎のウイルス、単純ヘルペスウイルス (IおよびII型)、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、コロナウイルス、ルペラウイルス、はしかウイルス、ヴェリセラ、エプスタインバーウイルス、アデノウイルス、乳頭腫ウイルスおよび黄熱ウイルス。

これらの病原性ウイルスのいくつかの特定のウイルスの抗原は、Fタンパク質 (ことにFペプチド283-315を含有する抗原、W089/02935、発明者Paradiso, P. ら) およびRSウイルス (RSV) のNおよびGタンパク質、VP4 (VP3として従来知られている)、ロタウイルスのVP6およびVP7ポリペプチド、ヒト免疫欠損ウイ

ルの両者に対する免疫応答を引き出すために使用することができる補助ワクチン組成物を生成することができる。

本発明の補助ワクチン組成物において使用できる適当な抗原は、粒状抗原、例えば、バクテリア、ウイルス、寄生体または菌類および細胞の微小成分および可溶性抗原、例えば、タンパク質、ペプチド、ホルモンおよび糖タンパク質を包含する。とくに興味ある抗原は、ウイルス、菌類、寄生体またはバクテリアの抗原、アレルゲン、自己免疫関係抗原、または腫瘍関連抗原である。抗原は自然源から得ることができるか、あるいはそれらは組み換えDNA技術または他の人工的手段により産生することができる。

問題のバクテリアの抗原の例は、次のものを包含するが、これらに限定されないヒトのバクテリアの病原体とアソシエーションしたものである：例えば、分類可能なおよび不可能なインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、カタル球菌 (*Branhamella catarrhalis*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎杆菌 (*Klebsiella pn*

ルスのエンベロープ糖タンパク質およびB型肝炎の表面および前表面抗原およびヘルペス糖タンパク質BおよびD。

菌類の抗原を誘導することができる菌類は、次のものを包含するが、これらに限定されない：カンジダ (*Candida*) 種 (ことに *albicans*)、クリプトコックス (*Cryptococcus*) 種 (ことに *neformans*)、プラストムセス (*Blastomyces*) 種 (例えば、*dermatitidis*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma*) 種 (ことに *immitis*)、パラコキシドロイデス (*Paracoccidoides*) 種 (ことに *brasiliensis*) およびアスペルギルス (*Aspergillus*) 種。寄生体の抗原の例は、次のものを包含するが、これらに限定されない：プラスモジウム (*Plasmodium*) 種、エイメリア (*Eimeria*) 種、シストソマ (*Schistosoma*) 種、トリパノソマ (*Trypanosoma*) 種、バベシア (*Babesia*) 種、レイシマニア (*Leishmania*) 種、クリプトボリジア (*Cryptosporidia*) 種、トキソプラズマ (*Toxoplasma*) 種およびニューモスチス (*Pneumocystis*) 種。

自己免疫病、例えば、慢性関節リウマチおよびエリテマトードーデスに関連する種々の抗原はまた重要である。

免疫応答の変調はある数の重要な関係を有する。例えば、サイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子のアジュバントの作用は、ワクチン接種した有機体における接合体の抗原性部分に対して産生された保護的抗体の濃度を増加することができる。同様に、接合体と同時に投与された抗原に対する抗体の産生を増加することができる。その結果、

有効な（すなわち、保護的）ワクチン接種は、通常要求されるより少ない量の接合した抗原および／または同時に投与された抗原で達成することができる。接合された抗原および同時に投与された抗原の要求される量の減少は、調製が困難であるか、あるいは経費を必要とするか、あるいは免疫原的に弱いワクチンの使用をいっそう広げることができる。これは流行病、例えば、マラリアおよびコレラに直面しなくてはならない、非常に限られた医療の予算の、開発途上国の国民において真実である。それは、また、抗原が有効な免疫化のために通常要求される濃度で毒性であるとき、より安全なワクチン接種を提供することができる。抗原の量を減少することによって、毒性反応の危険は減少する。

他の応用は、また、ホルモンを包含する細胞の修飾因子の安定性またはそれらとそれらの対応するレセプターまたは結合性成分による相互作用を刺激または阻害する免疫応答を引き出すことを包含することができる。この方法において、免疫応答を使用して成長、再生、分化、および全体の性能を阻害／増強することができる。あるいは、免疫応答の量は操作して所望の保護的応答を最適化することができる。

本発明の特定の実施態様において、IL-2接合体は追加の利点を提供する；特定のBおよびT細胞への炭水化物を含有する抗原または他の結合はBおよびT細胞のインターリューキンのレセプターの付近にIL-2を集中させる。

サイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子は、それらの免疫調節活性により、限界的にまたは非免疫原性の接合した抗原および結合した非接合抗原に対して保護的免疫応答を引き出すことを促進することができる。このようにして、より大きいタンパク質の断片、合成

抗原または組み換えDNA技術の産生物を含有するワクチン組成物は、本発明の接合体との混合によりより効力のあるものとすることができる。

典型的には、ワクチン接種の養生法は「保護的」免疫応答を刺激するために数週または数か月にわたる抗原の投与を必要とする。保護的免疫応答は、ワクチンを向ける特定の病原体または複数の病原体による産生的感染から、免疫化した有機体を保護するために十分な免疫応答である。炭水化物を含有する抗原または他の抗原は、サイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子に接合し、そして必要に応じて同一であるか、あるいは異なる有機体からの抗原と同時投与するとき、保護的免疫応答の発生を修飾することができる。これは有効なワクチン接種の養生法の時間経過を減少する。さらに、本発明の免疫原性接合体からなるワクチン配合物は、ワクチン配合物の調製、輸送および貯蔵を可能とするために十分な期間の間安定である。

用語抗原の使用は、全抗原またはその抗原決定基の1つを意味し、そしてまた本発明の接合体の存在のために免疫応答の増加により有益でありうるハプテンの分子を包含することを、上の説明から、理解すべきである。抗原の上のリストは例示のみを目的とする。本発明の補助ワクチン組成物において使用することができる追加の抗原は、当業者により容易に確認することができる。

さらに、次の非限定的実施例によって、本発明をさらに説明する。

実施例1

PRP-rhIL-2接合体

組み換えヒトrhIL-2（1mgの凍結乾燥物、Cetus、カリフォルニア州エメリビル）を300μlの蒸留水で再構成し、そして

100μlのアリコートに分割した。各100μlのアリコートは333μgのrhIL-2を含有した。

PRPのオリゴ糖（重合度20：Dp20）を、次の3つの反応条件に従い、還元的アミン化〔アンダーソン（Anderson）P. W. の米国特許第4,673,574号、1987年6月16日発行、および米国特許第4,761,283号、1988年8月2日発行〕により、PRP対rhIL-2の2：1または20：1重量比でrhIL-2上にカップリングした（開始反応において）：

反応1

第1反応において、100μlのrhIL-2を2モルの重炭酸塩の緩衝液pH9.6（5μl）と混合し、これは反応混合物をpH8.5とした。シアノホウ水素化ナトリウム（脱イオン水の中の57mg/ml、2μl）を添加し、そしてこの溶液を30℃で24時間貯蔵した。

反応2

rhIL-2（100μl、333μg）をインフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）b型オリゴ糖の凍結乾燥したPRP（Hbo）（WW-2-65、600μg）と混合した。重炭酸塩の緩衝液2モルpH9.2（5μl）を添加して反応混合物をpH8.5とした。シアノホウ水素化ナトリウム（脱イオン水の中の57mg/ml、2μl）を添加し、そしてこの溶液を37℃で24時間貯蔵した。

反応3

rhIL-2（100μl、333μg）を凍結乾燥したHbo（WW-2-65、6.0mg）と混合した。重炭酸塩の緩衝液2モルpH

9.2（5μl）を添加して反応混合物をpH8.5とした。シアノホウ水素化ナトリウム（脱イオン水の中の57mg/ml、2μl）を添加し、そしてこの溶液を37℃で24時間貯蔵した。

24時間後、反応混合物の各々を8,000分子量の膜を使用して数回交換した生理的塩類溶液に対して透析して、無機のイオン、例えば、シアニオンを除去した。粗製反応混合物のHPLC分析をウルトラヒドロゲル（Waters、マサチューセッツ州ミッドフォード）のカラム125/250でリン酸緩衝液中で実施すると、非接合rhIL-2に比較して、タンパク質成分（接合したrhIL-2）の大きさは増加することが示された（第1図）。

第1図は、PRP対rhIL-2の20：1の比において、PRP-rhIL-2の粗製接合体混合物のHPLCクロマトグラムを示す。この混合物をリン酸緩衝液生理的塩類溶液の中のウルトラヒドロゲルのカラムで分析した。第2図および第3図は、それぞれ、PRP対rhIL-2の2：1の比のPRP-rhIL-2についておよびモック接合体についてのHPLCクロマトグラムを示す。

次いで、粗製接合体を、ドットプロット分析により、モノクローナル抗PRP抗体（E1117-5；Lab Service, Praxis Biologics, Inc.、ニューヨーク州ロチェスター）を使用してPRPのrhIL-2へのカップリングについて試験した。1または2モルの接合体をニトロセルロース紙上に適用し、そして室温において10分間空気乾燥した。この紙をBLOTTO（10ミリモルのリン酸ナトリウム緩衝液生理的塩類溶液pH7.2、150ミリモルのNaCl中の5%の非脂肪乾燥ミルク）でブロッキングした。プロット

特表平4-506662 (8)

表 I

接合体ワクチンの PRP-rhIL-2 の安定性
刺激指数 (対照の応答の % として表す)
接合反応後の日数

刺激因子	10	20	40	50	70
モック					
接合体	37	1.5	2.5	18	8
PRP-rhIL-2 (2:1)	33	4.9	61	40	17
PRP-rhIL-2 (20:1)	68	23	86	91	95
PRP-CRM ₁₉₇ (HbOC)	0	0	0	0	0

をモノクローナル抗 PRP 抗原と反応させた。BLOTTING でよく洗浄した後、プロットを HPR-ヤギ抗マウス抗体と反応させた。プロットを 0.01% の過酸化水素; 0.06% の 4-クロロ-1-ナフトールを含有する溶液 (Sigma Chemical Co., ミソリー州セントルイス) で展開した。rhIL-2 または PRP 単独は反応性を示さず、そして PRP-rhIL-2 接合体は陽性の反応性を示した。PRP 単独はニトロセルースに結合しないので、データが示唆するように PRP は rhIL-2 にカップリングする (第 4 図)。

生物学的活性

接合体を 4℃ で貯蔵しそして種々の日数後、rhIL-2 の活性を生物学的アッセイにおいて ATCC から得られた CTL 細胞系を使用しモニターした。CTL は rhIL-2 依存性細胞系であり、そしてこれらの細胞からの rhIL-2 の刺激はこれらの細胞の死を生ずる。簡単に述べると、 5×10^5 の CTL 細胞を種々の濃度の rhIL-2 または PRP-rhIL-2 とともに培養した。CTL の成長を [³H]-チミジンの組み込みによりモニターした (表 I)。

表 I は、種々の PRP-rhIL-2 接合体の中のインターリューキン-2 の生物学的活性を示す。rhIL-2 および接合体を種々の濃度で 3×10^5 の CTL 細胞を含有する培養物の中に滴定した。細胞の成長を [³H]-チミジンの組み込みにより測定した。データは対照の応答の % として表す。刺激の指数は、rhIL-2 の標準の調製物を使用して得られた値に対して正規化する。データから、PRP-rhIL-2 (20×) は PRP-rhIL-2 (2×) およびモック rhIL-2 接合体よりすぐれた rhIL-2 活性を有する。

PRP-rhIL-2 接合体ワクチンの免疫原性:

スイスウェプスター (Swiss-Webster) マウス (Taconic Farms, ニューヨーク州ジャーマンタウン) を PRP-rhIL-2 (20:1) または PRP-rhIL-2 (2:1) 接合体ワクチンで免疫化した。各ワクチンは 5 匹の動物の群で試験した。PRP-CRM₁₉₇ 接合体 (HbOC, Praxis Biologicals, Inc., ニューヨーク州ロチェスター) を陽性の対照として使用した。PRP-rhIL-2 接合体接合体 (4℃ で 135 日間貯蔵した) を、アジュバントを使用しないで、マウスに 10 または 1 μg の rhIL-2 の量で注射した。PRP-CRM₁₉₇ を 1 μg の PRP/マウスで使用した。次いで、マウスを 2 週で同一の投与量および投与ルートを使用して促進した。血清試料を 0、2 および 4 週で取り、プールし、そして次の手順に従いファー (Farr) アッセイにより PRP に対する抗体の応答を決定した:

表 II

PRP-rhIL-2 接合体ワクチンに対する抗 PRP 抗体の応答

ワクチン	投与量 (μg)	抗 PRP 抗体 (μg/ml)*		
		Wk0	Wk2	Wk4
PRP-rhIL-2 (20:1)	10	0.17	2.0	3.0
PRP-rhIL-2 (20:1)	1	0.10	2.0	5.37
PRP-rhIL-2 (2:1)	10	0.10	3.54	4.18
PRP-rhIL-2 (2:1)	1	0.14	2.0	4.20
HbOC	1	0.10	2.0	8.71

PRP に対する抗体を標準化したファー (Farr) ラジオイムノアッセイにより決定した。血清、血清の標準およびアッセイの対照の種々の希釈物を胎児ウシ血清中で調製し、そして 25 μl のアリコート、二重反復試験において、1.5 μl のエッペンドルフ (Eppendorf) 管に移した。 [³H]-PRP (50 μl) を [³C1] - トレーサーとともにすべての管に添加した。試料を滴形成し、そして 4℃ において一夜インキュベーションした。飽和硫酸アンモニウム溶液 (75 μl) をすべての試料に添加し、次いで試料を滴形成し、そして 4℃ において 40 分間インキュベーションした。上澄み液を注意して吸引し、そして 400 μl の蒸留水をすべての沈澱に添加した。滴形成後、バイアルの内容物全体およびバイアルそれ自体を 10 ml のシンチレーション流体を含有するシンチレーションバイアルに入れた。激しく攪拌した後、バイアルを液体シンチレーションカウンターで計数した。PRP に結合した抗体の濃度を、既知の標準と比較して、計算した。

表 II は、種々の接合体ワクチンで免疫化したマウスにおいて引き出された抗 PRP 抗体の応答を示す。2~3.5 μg の変化する一次抗 PRP 抗体の応答を異なるワクチンを使用して観測した。促進可能な応答をワクチンの大部分を使用して第 4 週に観測した。PRP-rhIL-2 (20:1) は、インフルエンザ菌 (Haemophilus influenzae) b 型オリゴ糖 CRM₁₉₇ 接合体 (HbOC) のそれに匹敵する応答を誘発した。

PRP-rhIL-2 接合体ワクチンを rhIL-2 濃度に基づいて注射し、そして HbOC を PRP 濃度に基づいて使用した。

* 前の実験からのデータが示すように、PRP (DP20) 単独または PRP とタンパク質の混合物は PRP 抗体の応答を誘発しない。

実施例 2

PRP-rhIL-2 接合体

PRP-rhIL-2 ワクチンによるマウスにおける抗 PRP 抗体の誘発は、適当な B 細胞への PRP のターゲティングよりむしろ、IL-2 のキャリアー効果のためである可能性がある。この可能性を妨げるために、この仮説を相同性系において試験した。この現象を例示するために、PRP を組み換え rhIL-2 (BrIL-2) に共有的にカップリングし、そしてこの接合体をウシ系において免疫原性について試験した。

実施例1に記載するプロトコルに従い、PRPを組み換えウシIL-2に2:1および20:1 (PRP:IL-2)の比でカップリングさせた。24時間後、接合体を8,000分子量の膜を使用して生理的塩類溶液に対して数回透析して無機イオン、例えば、シアンイオンを除去した。粗製反応混合物をHPLC分によりウルトラヒドロゲル (Waters, マサチューセッツ州ミルフォード) のカラム125/250でリン酸塩緩衝液中で精製した。非接合BrIL-2と比較して、タンパク質成分大きさの増加は、すぐれた接合体を示唆する (第5図)。

精製した接合体および非接合BrIL-2をSDS-PAGEおよびウェスタンブロットにより評価した。材料を100 μ lの試料緩衝液 (0.2モルトリス緩衝液、5%のSDS、0.025%のプロモフェノールブルー、10⁻¹モルの2-メタノールおよび20%のグリセロールを含有する) 中に溶解し、そして100℃に5分間加熱した。バイオラッド (Bio-Rad) ミニタンパク質ゲル系 (カリフォルニア州レッドモンド) を使用して分析を実施した。ゲルは1.5mmの厚さであり、そして分離するゲルは15%のアクリルアミドを含有し、アクリルアミド対ビスの比は30:0.8であった (0.37モルのトリスHCl、pH8.8および0.1%のSDS)。積み重ねゲルは、アクリルアミド対ビスの同一比で、4.8%のアクリルアミドを含有した。

1~10 μ gの試料を含有する10~15 μ lを各レーンに適用した。電気泳動後、ゲルをエタノール:酢酸:水 (5:1:5) の中の0.125%のクーマシー (Coomassie) ブルーで少なくとも1時間染色し、液いで色素を含まない同一溶液系で脱色した。前以て染色した分子量の標準を使用して、タンパク質の比較的分子量の決定を促進し

た。染色しない二重反復試験のゲルをウェスタンブロット分析に使用した。ほぼ16,000ダルトンの分子量の主要なバンドをBrIL-2単独を負荷したレーンにおいて観測された。接合体はより高い分子量の領域において拡散したバンドとして現れる。接合しないBrIL-2の証拠は観測されなかった。

PAGEで分離された試料を、12ミリモルのトリス-883ミリモルのグリシンpH8.8中で室温において90分間0.45ミリアンペアで電気泳動的にニトロセルロース膜上に移した。膜をBLOTTO (リン酸塩緩衝液生理的塩類溶液の中の5%の非脂肪ドライミルク) 中で37℃において1時間ソーキングした。膜を前以て決定した濃度のモノクローナル抗PRP抗体 (E117-5) またはポリクローナルウサギ抗BrIL-2で37℃において1時間ブロービングし、そしてBLOTTOで洗浄した。結合した抗原をBLOTTO中の二次抗体に接合したセイヨウウサビベルオキシダーゼ (Kirkegaard and Perry, マリランド州) で37℃において1時間検出した。ブロットを3~4 \times PBSで洗浄し、そしてメタノール中に0.01過酸化水素; 0.06%の4-クロロ-1-ナフトールを含有するPBSで室温において20分間展開した。濾液を蒸留水に移すことによって反応を停止し、そして濾液をブロットングにより乾燥した。データを第6図に表す。抗PRP抗体は両者のPRP-BrIL-2接合体と反応したが、非接合BrIL-2と反応しなかった。接合体の分子量は、また、かなり増加した。遊離のPRPは、タンパク質にカップリングしないとき、ニトロセルロース膜に付着しない。データが示唆するように、PRPはBrIL-2に共价的にカップリングした。

抗BrIL-2は遊離のIL-2およびIL-2接合体と反応した。データは抗PRP抗体を使用して観測されたものに類似する。

IL-2上へのPRPの共有カップリングはアミノ酸分析により確認された。サッカライドはタンパク質のリジン残基のエプシロンアミノ基にカップリングするので、リジンの減少および独特ヒドロキシエチルリジンの発生をモニターした。データの分析が示すように、ヒドロキシエチルリジンはタンパク質上へのPRPの共有カップリングを実証している。

生物学的活性

接合体を4℃において貯蔵し、そしてウシIL-2の生物学的活性をバイオアッセイにおいてIL-2依存性ウシT細胞系、BT-2を使用してモニターした。これらの細胞系からのIL-2の刺激はこれらの細胞の死を生ずる。簡単に述べると、5 \times 10⁴のBT-2細胞を96ウェルの平らな底のマイクロ培養プレートの中の異なる濃度のBT-2またはPRP-BrIL-2接合体の存在下に培養した。48時間後、10 μ lのMTT [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド] 溶液を添加し (5mg/mlのPBS) そして20回混合した。MTTを生きている細胞により切断してダークブルーのホルマザン産生物を生成した。ホルマザン産生物をイソプロパノールの添加により550nmにおける吸収を測定することによって定量した。データを第7図に表す。2:1および20:1の両者の接合体は生物学的活性を保持し、これらは非接合体のBrIL-2より、それぞれ、100~1000倍低い。

PRP-BrIL-2接合体のワクチンの免疫原性

3匹の雌牛を接合体のワクチンで免疫化した。PRP-CRM₁₉₇ (H

bOC) 接合体ワクチンを陽性の対照として使用し、そしてPRPとBrIL-2との混合物を陰性の対照として使用した。すべてのワクチンはリン酸アルミニウム中で1mg/mlの濃度で配合した。各動物に10 μ gのPRP/投与量を与えた。雌牛を前以て採血して前以て存在するPRPに対して抗体レベルを推定し、そして高い抗PRP力価をもつものを実験と対照の群の間に等しく分布させた。

動物を2mlの体積の10 μ gのPRPまたは接合体で第0週に皮下的に免疫化し、そして第1および2週に採血した。ワクチンの第2投与量を第2週に投与し、そして血液を第3および4週に集めた。PRPに対する抗体の応答を標準化したファール (Faar) ラジオイムノアッセイにより前に記載したように測定した。幾何平均の抗PRP抗体の力価を表11に表す。PRP-IL-2 (2:1) 接合体は免疫前の抗体レベルより2.3倍高い抗PRP抗体を第3週に誘発し、そしてPRP-IL-2 (20:1) は第3週にはほぼ3倍の増加を誘発した。HbOC、ヒトPRP-CRM₁₉₇ワクチン配合物は、第3週に6倍の抗PRP力価の増加を誘発した。PRPは、BrIL-2と混合すると、抗PRP抗体レベルの有意の上昇を誘発しなかった。データが示唆するように、PRP-IL-2 (2:1) および (20:1) 接合体はワクチンを適当なリンパ球上にターゲティングして応答を刺激する。

表 I I I

PRP-B r I L-2 接合体に対するウシ抗PRP抗体の応答

抗原	GMT 抗PRP抗体				
	Wk 0	Wk 1	Wk 2	Wk 3	増加(倍)*
PRP+IL-2	0.70	0.46	0.54	.46	なし
PRP-CRW ₁₉₇ (HbOC)	0.38	0.38	0.98	2.3	6.1
PRP-IL-2 (20:1)	0.35	0.48	0.55	1.0	2.8
PRP-IL-2 (2:1)	0.31	0.35	0.36	.71	2.3

*第3週における増加(倍)は第0週の抗体の力価を越えた増加として表す。

同等の実施態様

当業者は、日常の実験を越えないものを使用して、ここにおいて特定の記載した本発明の特定の実施態様に対する多数の同等の実施態様を認識するか、あるいは確認することができるであろう。このような同等の実施態様は次の請求の範囲内に包含される。

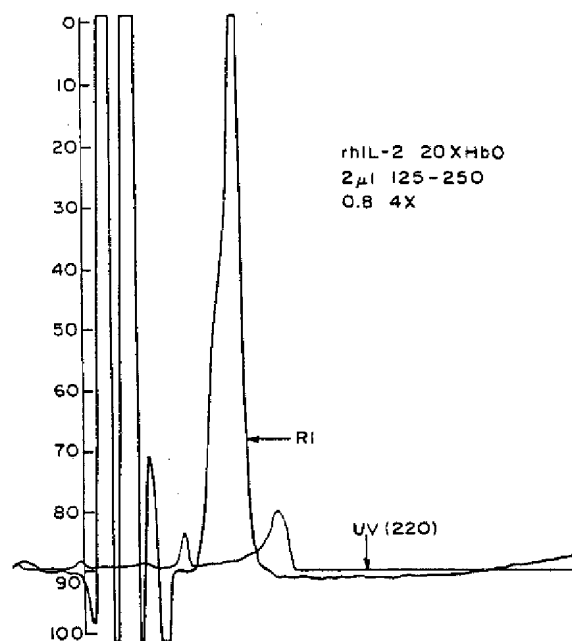


FIG. 1

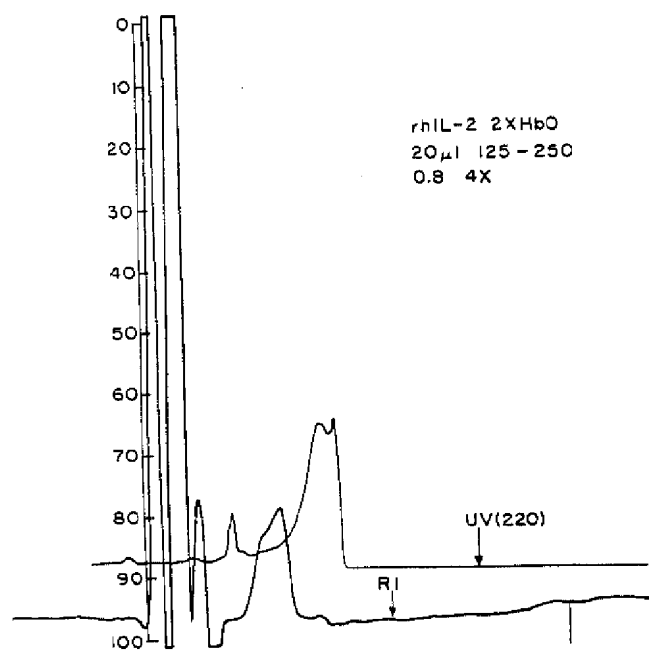


FIG. 2

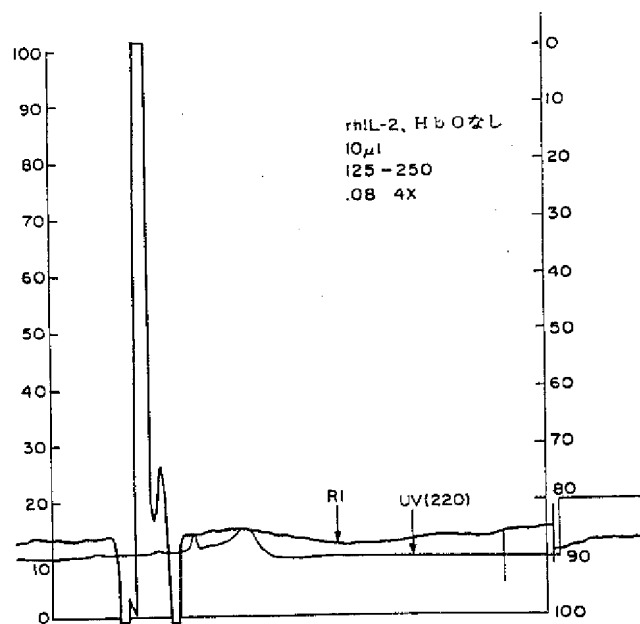


FIG. 3

1	2	3	4	5	6	7	8
0	0	0	0	0	0	0	0

1. PRP-CRM
2. IL-2 のみ
3. PRP のみ
4. PRP-IL-2 (2X)
5. PRP-IL-2 (2X)
6. —
7. PRP-IL-2 (20X)
8. PRP-IL-2 (20X)

FIG. 4

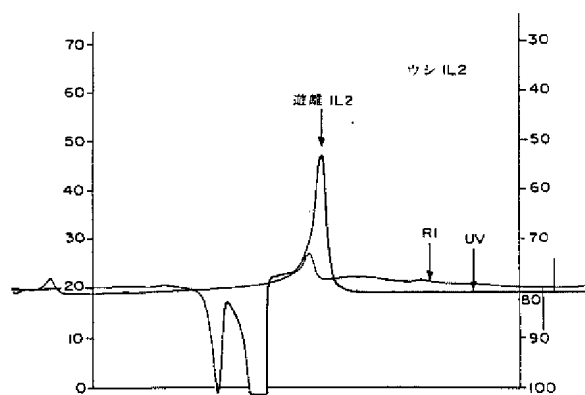


FIG. 5a

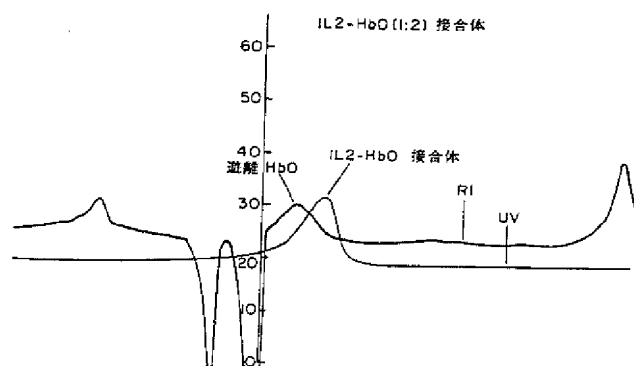


FIG. 5b

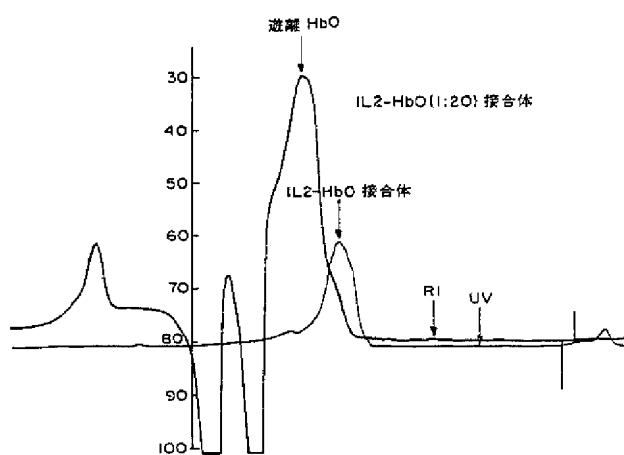
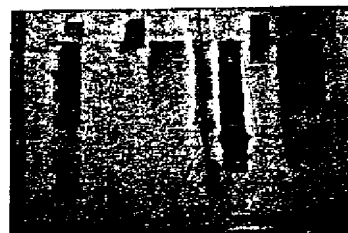


FIG. 5c

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



抗PRPを使用するブローピング

- 1) ブランク
- 2) 低分子量マーカー
- 3) ウシ IL-2
- 4) PRP-IL-2 (20:1)
- 5) PRP-IL-2 (2:1)

抗B r IL-2を使用するブローピング

- 6) 低分子量マーカー
- 7) ウシ IL-2
- 8) PRP-IL-2 (20:1)
- 9) PRP-IL-2 (2:1)
- 10) ブランク

FIG. 6

平成4年1月10日

特許庁長官 深 沢 亘 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US90/03983

2. 発明の名称

接合体ワクチンのためのサイトカニンおよびホルモンのキャリアー

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国ニューヨーク州14623
ロチェスター・イーストリバーロード300

名 称 プラクシス・バイオロジクス・インコーポレーテッド

4. 代理人 〒107

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号
日本自転車会館

氏 名 (6078) 弁理士 小田島 平吉

電 話 3585-2256



5. 補正書の提出年月日

1991年8月6日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通

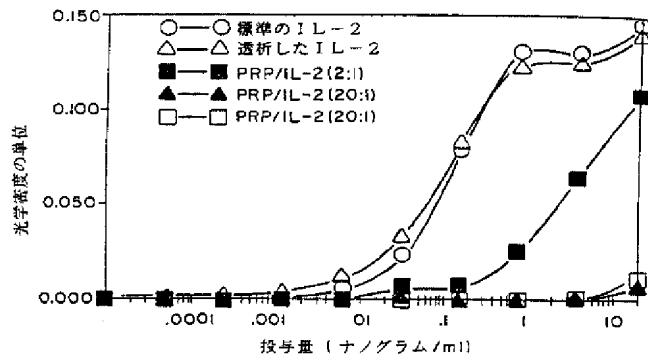
方式
審査

FIG. 7

請求の範囲

1、そのレセプターが免疫系の細胞上で発現されそしてその接合により抗原に対する免疫応答を修飾することができる、サイトカニン、リンホカイン、ホルモン、成長因子またはその一部分へ結合した抗原からなり、前記抗原は常態でサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしていない、免疫原性接合体。

2、サイトカニンまたはリンホカインはインターフェロン、インターリューキン-1 α 、インターリューキン-1 β 、インターリューキン-2またはその一部分である、上記第1項記載の接合体。

3、ホルモンまたは成長因子は、腫瘍壊死因子、プロラクチン、表皮成長因子、組織成長因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン様成長因子、ソマトロピンまたはインスリンである、上記第1項記載の接合体。

4、抗原はウイルス、バクテリア、菌類または温血動物またはヒトの病原体の寄生体の抗原である、上記第1項記載の接合体。

5、抗原は炭水化物を含有する抗原、バクテリアの莢膜のポリマーまたはオリゴマー、バクテリアの細胞壁のペプチドグリカン、バクテリアのリポ多糖またはこれらの断片である、上記第1項記載の接合体。

6、バクテリアの莢膜のポリマーまたはオリゴマーは、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、大腸菌(Escherichia coli)、髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、化膿連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)、カタル球菌(Branhamella

catarrhalis)、コレラ菌(Vibrio cholerae)、ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae)、淋菌(Neisseria gonorrhoeae)、百日咳菌(Bordetella pertussis)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、肺炎桿菌(Klebsiella pneumoniae)または破傷風菌(Clostridium tetani)から誘導される、上記第5項記載の接合体。

7、バクテリアの莢膜のポリマーまたはオリゴマーはポリリポシルビートルホスフェートである、上記第6項記載の接合体。

8、ポリマーまたはオリゴマーは、肺炎連鎖球菌(S. pneumoniae)の血清型1、4、5、6A、6B、9V、14、18C、19Fまたは23Fからのものである、上記第6項記載の接合体。

9、バクテリアの莢膜のポリマーまたはオリゴマーは、髄膜炎菌(N. meningitidis)のグループAまたはグループCの莢膜のサブユニットである、上記第6項記載の接合体。

10、製剤学的に許容されうる賦形剤および任意のアジュバントの中の免疫原性接合体からなり、前記免疫原性接合体は、そのレセプターが免疫系の細胞上で発現されそしてその接合により抗原に対する免疫応答を修飾することができる、サイトカニン、リンホカイン、ホルモン、成長因子またはその一部分へ結合した抗原からなり、前記抗原は常態でサイトカニン、リンホカイン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしていない、ワクチン組成物。

11、サイトカニンまたはリンホカインはインターフェロン、イン

国際調査報告

ターリューキン-1 α 、インターリューキン-1 β 、インターリューキン-2またはその一部分である、上記第10項記載のワクチン組成物。

12、ホルモンまたは成長因子は、腫瘍壊死因子、プロラクチン、表皮成長因子、組織成長因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インスリン様成長因子、ソマトロピンまたはインスリンである、上記第10項記載のワクチン組成物。

13、抗原はバクテリア、菌類または温血動物またはヒトの病原体の寄生体の抗原である、上記第10項記載のワクチン組成物。

14、製剤学的に許容される賦形剤および任意のアジュバントの中、免疫原性接合体と混合された、抗原またはその断片からなり、前記免疫原性接合体は、そのレセプターが免疫系の細胞上で発現されそしてその接合により抗原に対する免疫応答を修飾することができる、サイトカニン、リンホカニン、ホルモン、成長因子またはその一部分へ結合した抗原からなり、免疫変異活性を有し、前記抗原は常態でサイトカニン、リンホカニン、ホルモンまたは成長因子とアソシエーションしていない、接合された抗原および少なくとも1種の他の抗原に対して免疫応答を引き出すための補助ワクチン組成物。

15、インターリューキン-2に結合したポリリボシルリビートルホスフェートからなり、インターリューキン-2はポリリボシルリビートルホスフェートの免疫原活性を修飾することができる、免疫原性接合体。

International Application No. PCT/US 90/03983	
Classification of Subject Matter (according to the International Patent Classification (IPC) 5, A 61 K 47/48, A 61 K 39/385)	
IPC 5, A 61 K 47/48, A 61 K 39/385	
Field of Search	
IPC 5, A 61 K, C 07 K	
Documents searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in the Field Searched	
Documents considered to be relevant	
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
P, X	WO, A, 89/12458 (CELL MED, INC.) 28 December 1989 see page 1, paragraph 1 - page 7, paragraph 5; page 28, paragraph 3 - page 29, paragraph 2; page 38, paragraph 2; page 45 - page 49, example 4; claims 1-6
Y	WO, A, 88/05843 (INGUNEX CORPORATION) 22 September 1988 see page 1, line 6 - page 2, line 11; page 13, lines 17-32
Y	EP, A, 0098581 (CONNAUGHT LABORATORIES) 18 January 1984 see page 1, paragraphs 1, 2; page 2, paragraph 3 - page 5, paragraph 2
<p>Special categories of cited documents:</p> <p>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"X" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"Y" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"Z" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"P" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"C" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"D" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"E" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"F" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"G" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"H" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"I" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"J" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"K" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"L" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"M" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"N" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"O" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"P" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"Q" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"R" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"S" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"T" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"U" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"V" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"W" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"X" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"Y" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p> <p>"Z" documents published after the international filing date of the application but prior to the date of publication of the application, which are cited in the application as prior art.</p>	
Date of the Actual Completion of the International Search	
20th September 1990	
International Searching Authority	
EUROPEAN PATENT OFFICE	
Date of Mailing of the International Search Report	
30 OCT 1990	
Signature of Authorized Person	
D. S. KOWALCZYK	

Form PCT/ISA (2) (January 1989)

International Application No. PCT/US 90/03983		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
Y	US, A, 4673574 (P.W. ANDERSON) 16 June 1987 see column 2, line 50 - column 3, line 39; column 4, lines 25-53; claims (cited in the application)	1-30, 35-55
Y	The Journal of Immunology, vol. 139, no. 3, 1 August 1987, The American Association of Immunologists, Baltimore, (US), L. Nencioni et al.: "In vivo immunostimulating activity of the 163-171 peptide of human IL-1 β ", pages 800-804, see page 800, abstract; page 803, paragraph 3 (cited in the application)	1-30, 35-55

Form PCT/ISA (2) (January 1989)

International Application No. PCT/US 90/03983	
FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
<p>V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE:</p> <p>The international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) to the following reasons:</p> <p>1. Claim numbers because their claims are so broad that they are not directed to a specific invention.</p> <p>2. Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 8.1(a).</p> <p>VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING:</p> <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:</p> <p>1. As no requested additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.</p> <p>2. As only some of the requested additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claiming:</p> <p>3. As no requested additional search fees were timely paid by the applicant, consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:</p> <p>4. As all requested search fees could be searched without effecting an additional fee, the international Searching Authority did not require payment of any additional fee.</p> <p>5. The additional search fees were accompanied by applicant's demand.</p> <p>6. No request accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA (2) (January 1989)

国际调查报告

US 9003983
SA 38836

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office EDP file on 23/10/90. The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A- 8912458	28-12-89	AU-A- 3777989	12-01-90
WO-A- 8806843	22-09-88	US-A- 4879374	07-11-89
		AU-A- 1426468	10-10-88
		EP-A- 0349569	10-01-90
EP-A- 0098581	18-01-84	US-A- 4496538	29-01-85
		AU-B- 561978	21-05-87
		AU-A- 1822783	08-02-84
		CA-A- 1210695	02-09-86
		WO-A- 8400300	02-02-84
		US-A- 4619828	28-10-86
		US-A- 4644059	17-02-87
US-A- 4673574	16-06-87	US-A- 4752713	09-08-88
		US-A- 4761283	02-08-88
		US-A- 4902506	20-02-90

For more details about this annex: see Official Journal of the European Patent Office, No. 32/82